Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung und Wirkung des Bruchkrautes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt

von

Arzt **Friedrich Daebler**

aus **Rostock.**

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Rostock.

Rats- und Universitäts-Buchdruckerei von Adlers Erben, G. m. b. H.

1914.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Rostock.

Referent: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Kobert.

Meinem lieben Freunde

Herrn Dr. med. Kossow

zugeeignet.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einige einleitende historische und botanische Bemerkungen . 5
II. Was ist bis jetzt über Herniariasaponine bekannt? 7
III. Ermittlung des Darstellungsganges der Herniariasaponine . . 10
A. Untersuchung der Geheschen Droge 10
1. Untersuchung auf das neutrale Saponin 11
a. Biologische Untersuchung 11
b. Chemische Untersuchung 12
2. Untersuchung auf das fragliche saure Saponin 14
B. Untersuchung des Riedelschen Dekoktes 15
1. Untersuchung auf ein saures Saponin 15
2. Untersuchung auf das neutrale Saponin 16
C. Gesamtergebnisse über die Untersuchung der beiden Handelswaren 18
IV. Reindarstellung und Ermittlung des Wirkungswertes der Saponinsubstanzen der Herniaria 19
1. Gewinnung und Wirkungsstärke des neutralen Saponins . . 21
a. Methylalkoholmethode 21
b. Bleimethode 22
Versuche an Blut und Blutkörperchen 22
Versuche an Kaulquappen 26
2. Gewinnung und Wirkungsstärke des Sapogenins aus dem neutralen Saponin 27
3. Quantitative Gewinnung und Wirkungsstärke des sauren Saponins 29
4. Bewertung der Droge nach dem Kobertschen Verfahren . . 31
V. Versuche am Hund mit innerlicher Darreichung des Dekoktes 32
1. Wirkung auf den Harn 32
2. Wirkung auf den Kot 42
Lebenslauf 47

I. Einige einleitende historische und botanische Bemerkungen.

Das zu den Caryophyllaceae, Unterfamilie Alsinaceae, gehörige Bruchkraut, Hornkraut, Dürrkraut oder Tausendkorn hat nach Linné zwei Arten, die er als Herniaria glabra und Herniaria hirsuta bezeichnete, während Sprengel sie als Herniaria vulgaris zusammenfaßt. Erstere ist kahl, letztere behaart. Nach Sprengel[1]) wird sie zuerst von Tragus erwähnt, doch dürfte die Volksanwendung bei Brüchen, die ihr den Namen Bruchkraut verschafft hat, wohl weit älter sein. Dragendorff[2]) spricht die Vermutung aus, daß sie schon den Arabern bekannt war. Nach der 1905 erschienenen zweiten Auflage der Realencyklopädie der gesamten Pharmazie (Bd. 6, S. 329) soll sie in Deutschland, Österreich und Spanien noch jetzt offizinell sein; für Deutschland trifft dies jedoch jetzt nicht mehr zu. Nach Strumpf[3]) hatte sie vor seiner Zeit als Diureticum und Wundmittel eine Rolle gespielt. Die Anwendung bei Wassersucht, Nieren- und Blasenleiden wird auch von J. Moeller (in der genannten Encykl.) erwähnt, aber hinzugesetzt, die Berechtigung einer solchen Anwendung sei nicht erwiesen.

---

[1]) Curtius Sprengel, Historia Rei Herbariae Tomus 1 (Amstelodami 1807), p. 318.

[2]) Georg Dragendorff, Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten (Stuttgart 1898), S. 209.

[3]) Ferd. Ludw. Strumpf, System. Handbuch der Arzneimittellehre, Bd. 1 (Berlin 1848), S. 209.

Von neueren Autoren hat der bekannte Wiener Syphilidolog Zeissl sen. unsre Droge, Herba Herniariae, als sie schon fast vergessen war, aus dem Dunkel wieder hervorgeholt und sie auf Grund sehr zahlreicher klinischer Versuche gegen Syphilis und fast als Spezifikum bei Blasenkatarrh, namentlich zur Beruhigung des Krampfes der Blasenmuskeln, aufs wärmste empfohlen.

Die Wurzel der auf sandigen Plätzen auch bei uns häufigen Pflanze ist spindelig; die Stengel bis 30 cm lang. Die Pflanze bildet einen flach an den Boden angedrückten Rasen. Die Blätter sind klein, sitzend länglich oder eiförmig, ganzrandig, stumpf oder spitz, mit häutigen eiförmigen Nebenblättern. Die grünlichgelben fünfzähligen Blüten in blattwinkelständigen 5—10blütigen Knäueln sind am Gipfel der Ästchen ährenförmig gehäuft. Die Blumenblätter sind borstlich, die Schließfrüchtchen einsamig, häutig, von unveränderten Kelchen bedeckt.

Das frische Kraut ist geruchlos; beim Trocknen fängt es an, dem Steinklee ähnlich nach Kumarin zu duften. Als Ursache dieses Geruches hatte M. Gobley[1]) einen kristallisierenden, bei 116° schmelzenden Körper von eigentümlichem, angenehmem Geruch, das Herniarin, aufgefunden. Barth und Herzig[2]), die diesen Stoff weiter untersuchten, erkannten ihn als den Methyläther des Umbelliferons $C_{10}H_{18}O_3$. Er bildet in reinem Zustande farb- und geruchlose Kristalle vom Schmelzpunkt 117—118°. Beim Schütteln mit Wasser, in dem sich die Kristalle nur wenig lösen, oder beim Erhitzen auf 100° entwickelt sich ein deutlicher Geruch nach Kumarin. In Alkohol und Äther ist Herniarin leicht löslich. Die Lösung in konz. Schwefelsäure zeigt blau-

[1]) Journal de Pharmacie et de Chimie [4 Série] Tome **20**, 1874, S. 270.

[2]) Wiener Akad. Sitz.-Ber., Math.-Naturw. Klasse, Bd. **98**, 1889, S. 150.

violette Fluoreszenz. Die Ausbeute beträgt 0,2 %. Dieses Herniarin dürfte vielleicht der Träger des die Blasenmuskulatur beruhigenden Wirkung unserer Droge sein, doch fehlen darüber leider spezielle Versuche.

Ein von dem Spitalapotheker Schneegans[1]) in Straßburg in unserer Droge gefundenes Alkaloid, das Paronychin, ist in Äther und in Alkohol leicht löslich. Es riecht widerlich. Bei Fröschen bedingt es eine Lähmung des Zentralnervensystems. Vielleicht unterstützt es die Wirkung des Herniarins auf die Blasennerven.

II. Was ist bis jetzt über Herniaria-Saponine bekannt?

Neben den im Vorstehenden genannten Stoffen enthält unsere Droge nach Barth und Herzig auch eine Saponinsubstanz, die in das klinisch ja ausschließlich verwendete Infus oder Dekokt des Krautes übergeht. Da vom Herniarin in diese wässrigen Auszüge nur recht wenig übergeht, glauben die Genannten, den Hauptanteil an der klinischen Wirkung auf dieses Saponin beziehen zu müssen. Wie alle Saponine, so ist auch dieses Herniariasaponin ein Glykosid, dessen Formel in der Zusammenstellung von Kobert[2]) zu $C_{57}H_{90}O_{30}$ angegeben wird. Diese ist das Dreifache von $C_{19}H_{30}O_{10}$ und gehört demnach in die Kobertsche Reihe $C_nH_{2n-8}O_{10}$. Die von Koberts Schüler Witold von Schulz gemachten Analysen beziehen sich auf ein Präparat von Barth und Herzig, welches jedoch 7 % Kalk und Magnesia enthielt. Von unserm jetzigen Standpunkt aus muß der Verdacht aufsteigen, daß dieses

[1]) Journal der Pharmazie für Els.-Lothringen.

[2]) R. Kobert, Saponine. Enthalten in Biochem. Handlexikon, herausgegeben von E. Abderhalden, Bd. 7 (Berlin 1912), S. 181.

Präparat kein reines, neutrales Saponin war, sondern das Kalk- und Magnesiasalz eines sauren Saponins einschloß. Neue Analysen dürften unter Berücksichtigung dieser Tatsache vielleicht andere Ergebnisse liefern. Bei Barths und Herzigs Analysen wurde dieses Herniariasaponin durch Salzsäure außer in Zucker in eine Substanz gespalten, die ein Atom Sauerstoff mehr aufweist, als das von Rochleder gefundene bis dahin bekannte Sapogenin, nämlich das des Saponalbins der Radix Saponariae albae, das die Formel $C_{14}H_{22}O_2$ hat. Barth und Herzig haben daher ihre Substanz, der die Formel $C_{14}H_{22}O_3$ zukommt, Oxysapogenin benannt. Spätere Untersuchungen von Kobert beweisen, daß es nicht nur zwei Sapogenine, sondern mehrere Reihen von Sapogeninen gibt. Die eine Reihe $C_nH_{2n-6}O_2$ entspricht dem von Rochleder gefundenen Sapogenin. Die andere $C_nH_{2n-6}O_3$ ist die der dazu gehörigen Oxysapogenine, zu denen das Herniariasapogenin gehört. Kobert nennt die erste Reihe Sapogenole im Anschluß an das von Hesse zuerst genau untersuchte erste Glied dieser Reihe $C_{12}H_{18}O_2$, dem Hesse den Namen Sapogenol gab. Die andere Reihe ist die der Oxysapagenole.

Barth und Herzig haben nun damals, um die Eigenschaften des Herniariasaponins festzustellen, dasselbe mit dem käuflichen Saponin der Saponaria alba verglichen. Da es damit chemisch nicht identisch schien, bedurfte es auch nach der physiol. Seite hin weitere Prüfung. Auf Bitten von Barth und Herzig stellte Prof. Exner dahingehende Forschungen an. Er verwandte dazu das Herniariapräparat in 5% und 1% Verdünnung. Eine Injektion von jedesmal $^1/_2$—2 ccm unter die Haut des Oberschenkels von Fröschen zeitigte folgendes Resultat: Es trat eine Störung in der Sensibilität wie Motilität des betreffenden Beines ein, die schließlich zur totalen Lähmung führte.

Und zwar wirkte bei diesen Versuchen eine 1 % Lösung der Herniaria-Substanz schneller und stärker als eine 5 % Lösung des käuflichen Saponins. Somit war also bewiesen und festgestellt, daß weder die physiologischen noch die chemischen Eigenschaften der beiden Saponin-Präparate identisch waren; es wurde dadurch leicht verständlich, daß auch die Sapogenine verschieden waren.

Nach den chemischen Untersuchungen der Herniaria glabra von Barth und Herzig findet sich über die pharmakologischen und chemischen Verhältnisse derselben einiges in den Arbeiten des pharmakalogischen Instituts zu Dorpat. Hier war es der schon genannte Witold von Schulz[1]), der in seinem „Beitrag zur Kenntnis einiger weiterer Saponinsubstanzen" über das Herniariasaponin etwa folgendes mitteilt: Das Herniariasaponin von Barth und Herzig hatte nach Abzug der beim Verbrennen sich ergebenden 7,0 % Asche die Zusammensetzung 54,70 % C u. 7,04 % H. Für die Formel $C_{19}H_{30}O_{10}$ berechnet sich 54,54 % C und 7,18 % H. Das Herniariasaponin kann also vielleicht in die von Kobert aufgestellte Reihe $C_nH_{2n-8}O_{10}$ eingestellt werden.

Nach Schulz hat nur noch Grein[2]) Elementaranalysen unserer Substanz gemacht. Er fand 52,95 % C und 7,59 % H, woraus er die Formel $C_{34}H_{59}O_{19}$ berechnet. Molekulargewichtsbestimmungen liegen nicht vor, jedoch nimmt Kobert aus hier nicht näher zu besprechenden Gründen an, daß die Schulzsche Formel, der er den Vorzug vor der von Grein gibt, zu verdreifachen ist.

Was nun die Wirkung des Herniariasaponins auf rote Blutkörperchen betrifft, so liegt darüber nur eine Angabe von Kruskal[3]) vor. Danach löst das Herniariasaponin 1 %ige Rinderblutsuspension noch bei einer Verdünnung

---

[1]) W. v. Schulz, Arbeiten des pharmakol. Instit. zu Dorpat, hsgb. von R. Kobert, **14**, 1896, S. 111.

[2]) Grein, Pharmaz. Ztg. Jg. **49**, 1904, S. 257.

[3]) Nikolai Kruskal, obige Dorpater Arb. **6**, 1891, S. 127.

1 : 40 000 auf. Daraus ergibt sich, daß es sowohl der Formel nach wie auch nach seiner Wirkung ein Glied der Gruppe der Saponin-Substanzen ist.

III. Ermittlung des Darstellungsganges der Herniariasaponine.

Nach der Besprechung der schon vorliegenden pharmakologischen Untersuchungen der Herniaria glabra will ich jetzt zu den von mir selbst angestellten übergehen. Die ersten Versuche mußten selbstverständlich der Ermittlung des oben besprochenen Saponins gelten und vor allem feststellen, ob die Droge nur ein Saponin oder deren zwei enthält, von denen das eine sauer und das andere neutral reagiert. Bei diesen Vorversuchen bin ich von 2 Präparaten ausgegangen. Zur Verfügung standen mir zunächst 1 kg Herba Herniariae glabrae, bezogen von der Firma Gehe u. Co. in Dresden, sowie 1 kg Decoctum Herniariae glabrae 1 : 1, hergestellt von der Firma J. D. Riedel in Berlin-Britz. Beide Präparate habe ich jedes für sich einzeln in Arbeit genommen, und ich will im folgenden über beide auch gesondert berichten. Beiden Firmen für die Lieferung der Ware besten Dank.

A. Untersuchung der Geheschen Droge.

10 g Herba Herniariae wurden 2mal mit je 100 ccm destill. Wasser unter Zusatz je einiger Tropfen kohlensaures Natron bis zur ganz schwach alkalischen Reaktion abgekocht. Die Kolaturen dieses Dekoktes wurden vereinigt und eingeengt, wobei sich eine schlammige Masse abschied, die eine Filtration notwendig, aber sehr schwierig machte. Sie ging sehr langsam und unvollkommen vor sich. Das Filtrat reagierte fast neutral. Es wurde mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt, wobei sich ein deutlicher Niederschlag bildete. Dieser wurde nach dem Absetzen auf dem Filter gesammelt. Seine Farbe war braungrau.

Dieser Niederschlag mußte, falls in der Droge ein in das Dekokt übergehendes saures Saponin vorhanden ist, dieses in sich einschließen, während das Filtrat die Gesamtmenge des neutralen Saponins enthalten mußte. Eine Vorprobe mit einer kleinen Menge des fraglichen sauren Saponins, das in 10 ccm physiol. Kochsalzlösung unter Zuhilfenahme von einigen Tropfen kohlensaurer Natronlösung gelöst worden war und neutral reagierte, ergab in der Tat, auf 3 Proben verteilt, mit Menschenblut Hämolyse. Es kam also jetzt darauf an, mit der Gesamtmenge des neutralen Saponins in dem Filtrat und der Gesamtmenge des sauren Saponins auf dem Filter biologische und chemische Versuche anzustellen, ob hier wirklich 2 Saponine vorhanden sind.

Ich untersuchte naturgemäß gesondert auf das neutrale und auf das saure Saponin.

1. Untersuchung auf das neutrale Saponin.

Die vorhandene hellbraune Filtratflüssigkeit wird in zwei Teile geteilt, von denen die eine Portion biologisch, die andere chemisch untersucht wird.

a. Biologische Untersuchung.

6 cm^3 des fraglichen neutralen Saponins, entsprechend 2 g Droge, wurde neutralisiert. Von diesen werden in drei Reagenzgläschen in das erste 3, in das zweite 2 und in das dritte 1 cm^3 eingefüllt und dann physiologische Kochsalzlösung bis zur Marke 5 aufgefüllt. Ferner wird zur Kontrolle ein Gläschen mit 5 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Dann werden in jedes Gläschen 2 Tropfen defibriniertes Plazentarblut vom Menschen getan, worauf fast momentan in allen drei Gläschen totale Hämolyse erfolgt.

Da ja nur von 10 g Kraut ausgegangen wurde, und ich ja nur den fünften Teil der das neutrale Saponin enthaltenden Flüssigkeit verwendet habe, ist dadurch bewiesen, daß reichliche Mengen eines neutralen Saponins in der von mir geprüften Portion, d. h. in dem durch Ansäuern nicht fällbaren Teile des Dekoktes vorhanden waren.

b. Chemische Untersuchung.

Nach Zusatz von noch ein wenig verdünnter Schwefelsäure wurden 12 cm³ der Filtrat-Flüssigkeit, die ganz klar ist, eine Stunde lang im Wasserbade erhitzt. Schon nach wenigen Minuten verliert sich dabei ihre Durchsichtigkeit und scheidet beim weiteren Kochen auf dem Dampfbad eine dicke Gallerte ab, die namentlich nach dem Abkühlen noch reichlicher und daher deutlicher wahrnehmbar wird.

Diese Niederschlagsbildung ist der Beweis, daß durch das Kochen mit Säure ein Saponin, welches in saurem Wasser löslich war, gespalten worden und in ein Sapogenin übergegangen ist; denn alle Sapogenine sind in saurem Wasser unlöslich, namentlich beim Abkühlen.

Dieses gallertige Sapogenin wurde jetzt zwecks biologischer Untersuchung auf einem Filter gesammelt, etwas gewaschen und dann in natronkarbonathaltiger Kochsalzlösung neutral gelöst zu etwa 10 ccm. Von diesen genügte schon 1, ja selbst $^1/_2$ ccm, um in 5 ccm Volumen die Gesamtmenge der Blutkörperchen aus 1 Tropfen serumarmen Plazentarblutes sofort total zu hämolysieren.

Somit war die Existenz eines aus neutralem Saponin entstandenen Sapogenin sowohl chemisch wie biologisch nachgewiesen. Und zwar war die Wirkung des Sapogenins nicht schwächer als die des Muttersaponins. Schon seit vielen Jahren war bekannt, daß das Solanin auch nach Abspaltung der Zuckerkomponente noch giftig wirkt. Für die stickstofffreien Saponine glaubte Kobert früher nicht ohne weiteres zugeben zu dürfen, daß sie auch als Aglykone noch gewisse namentlich hämolytische Wirkungen haben. Nachdem Brandl (in München) jedoch für das Sapogenin der beiden Kornradensaponine[1]) eine erhebliche hämolytische Wirksamkeit erwiesen hatte, hat Kobert durch eine Reihe seiner Schüler für verschiedene Sapogenine zunächst die Wirkung auf Blut, später auch die aufs Herz bestätigen lassen können. Von den Arbeiten, die sich auf Blut beziehen, nenne ich

[1]) J. Brandl, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. **54**, 1906, S. 277.

die von Halberkann[1]), Laube[2]), Thieme[3]) und Bäck[4]). Die Wirkung vieler Sapogenine aufs isolierte Herz des Frosches wurde von Weinberg[5]) studiert. In Bezug auf Blutwirkung schließt sich also das Sapogenin des neutralen Herniariasaponins den anderen bis jetzt untersuchten Sapogeninen an, soweit diese in alkalischer Kochsalzlösung löslich sind. Die sogen. Endsapogenine sind z. T. im genannten Lösungsmittel ganz unlöslich und daher auf Blut unwirksam. Solche hat z. B. Sieburg[6]) dargestellt und geprüft.

Eine weitere Portion des Sapogenins aus dem neutralen Saponin der Futterrüben wurde zwecks weiterer Reinigung nach dem Lösen in kohlensaurem Natron nochmals in Salzsäure ausgefällt und von neuem auf dem Filter gesammelt und gewaschen. Mit diesem Sapogenin wurden 3 Versuche angestellt. Ein Teil wurde mit Essigäther erhitzt und das dabei Gelöste filtriert und verdunstet. Es hinterblieb eine sehr geringe Menge ziemlich heller Substanz, welche rasch auf Menschenblut total hämolytisch wirkte. Eine zweite Portion desselben Sapogenins wurde in Methylalkohol warm gelöst und die konzentrierte Lösung mit dem doppelten Volumen Äther versetzt, wodurch eine starke Ausscheidung hervorgerufen wurde. Es wurde nun gesondert die Ausscheidung und die ätherische Lösung untersucht. Die in Äther unlösliche Substanz erwies sich als für Menschenblut rasch und stark hämolytisch wirkend, während der Verdunstungsrückstand des Äthers nur schwach und langsam wirkte.

---

[1]) J. Halberkann, Über Assamin, das neutrale Saponin der Teesamen. Biochem. Ztschr., Bd. **19**, 1909, S. 50 des Sep.-Abdrucks.

[2]) Willib. Laube, Beiträge zur Kenntnis der Wirkung einiger Sapogenine und der zugehörigen Saponine auf das Blut. Ztschr. f. exp. Path. u. Ther., Bd. **10**, 1912, S. 28.

[3]) Fritz Thieme, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Wirkung der Sapogenine. Dissert. Rostock 1912.

[4]) Hans Bäck, Beiträge zur Kenntnis der Ausscheidung der Saponine durch den Kot. Diss. Rostock 1914.

[5]) Weinberg, noch nicht erschienen.

[6]) E. Sieburg, Über Helleborein, Archiv der Pharmazie, Bd. **251**, 1913, S. 154. — Derselbe, Über Strophanthinsäure. Berichte der D. pharmaz. Ges., Jg. **23**, 1903, S. 278.

Aus dem Angeführten geht hervor, daß sich das Sapogenin des neutralen Saponins aus heißem Methylalkohol und dann weiter aus Essigäther umreinigen läßt; zu Äther ist es nicht ganz so unlöslich wie das Saponin. Setzt man daher Äther zur konzentrierten Lösung in Methylalkohol, so wird die Hauptmenge ausgefällt, während in den Äther nur eine relativ geringe Menge übergeht.

2. Untersuchung auf das fragliche saure Saponin.

Die durch verdünnte Schwefelsäure aus dem filtrierten Dekokt abgeschiedene Substanz wurde auf dem Filter gesammelt, gewaschen und mit physiologischer Kochsalzlösung, die etwas Natron enthielt, in Lösung gebracht. Es ergaben sich etwa 8 ccm. In 3 Gläschen, wurden, in eines 3 ccm und in eines 1 ccm dieses Filtrates gebracht. Das 3. Glas bekam nur 5 ccm Kochsalz, und beide Gläser wurden bis zur Marke von 5 ccm aufgefüllt mit Kochsalz. Dann wurden alle Gläschen mit 2 Tropfen Plazentarblut versetzt und nach einmaligem Umschütteln sich selbst überlassen, wobei Glas 2 sofort totale Haemolyse und Glas 3 nach 10 Minuten beginnende Haemolyse zeigte, die allmählich vollständig wurde.

Daraus ergibt sich, daß in dem Herniariakraut, welches zu meiner Untersuchung benutzt worden war, eine in saurem Wasser unlösliche saure Substanz erhalten ist, die in schwach alkalisch hergestellte Abkochung übergeht, und die hämolytisch wirkt. Die Frage, ob diese ein saures Saponin oder ein präformiertes Sapogenin ist, konnte zunächst nicht entschieden werden, da die in Arbeit genommene Menge zu klein war, um beim Zerkochen sicher Zucker zu liefern. Es wurde daher der Versuch wiederholt mit einer etwas größeren Menge. Dabei ergab sich beim Zerkochen unzweifelhaft eine nicht unbeträchtliche Menge eines langsam reduzierenden Zuckers. Damit ist sichergestellt, daß vorher unbedingt ein saures Saponin vorhanden war. Es galt nun noch, die Sapogeninnatur der dabei ab-

gespaltenen Substanz biologisch nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurde sie auf dem Filter in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von kohlensaurem Natron gelöst und mit Plazentarblut geprüft. Es trat unzweifelhaft rasche Hämolyse ein.

Damit ist dargetan, daß tatsächlich neben dem neutralen auch noch ein saures Saponin in der Droge vorhanden war, das nicht nur an sich hämolytisch wirkt, sondern auch ein hämolitisch wirksames Anfangssapogenin in sich schließt.

B. Untersuchung des Riedelschen Dekoktes.

Ich gehe nun auf die Untersuchung des fertig bezogenen konzentrierten Dekoktes ein.

20 g davon, entsprechend 20 g Droge, welche eine schwach saure Reaktion haben, werden mit Bleiessig gefällt. Das Filtrat der Bleifällung gibt nach dem Entbleien mittelst kohlensauren Natron weder bei der biologischen Probe mit Plazentarblut noch bei energischem Kochen auf freiem Feuer mit Schwefelsäure eine Saponinreaktion. Es wird daher weggeworfen und geschlossen, daß durch Bleiessig sämtliche Saponinsubstanzen aus diesem Herniariadekokt quantitativ ausgefällt werden. Wir haben uns also im ferneren nur mit dem Bleiniederschlag zu beschäftigen. Dieser wird auf dem Filter gewaschen und mittelst kohlensauren Natrons versetzt. Dabei bildet sich eine gelbe, in Wasser unlösliche Substanz, welche im wesentlichen kohlensaures Blei und einen in der Droge enthaltenen gelben Farbstoff vorstellt. Es wird weggeworfen. Das Filtrat, welches von dunkelbrauner Farbe ist und stark alkalisch reagiert, wird auf Blei geprüft. Da es keine Bleireaktion gibt, wird es mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, wobei eine bleifreie Fällung entsteht, die vermutlich saures Saponin ist. Im Filtrat ist wahrscheinlich das neutrale Saponin. Beide werden im folgenden gesondert untersucht.

1. Untersuchung auf ein saures Saponin.

Der Niederschlag, welchen Schwefelsäure in dem Gemisch der beiden durch Bleiessig gefällten und von Blei wieder befreiten Saponine des Riedelschen Dekoktes hervorgerufen hatte, wurde von mir auf dem Filter gewaschen und alsdann mit kohlensaurem Natron und physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und filtriert. Es ergaben

sich etwa 10 ccm. Diese wurden scharf neutralisiert und sodann davon zu zwei Reagensgläschen, zu einem 2 ccm, zu einem 1 ccm, die auf 5 ccm mit Kochsalz aufgefüllt wurden, gesetzt. In ein drittes Gläschen wurden nur 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Nachdem zu jedem Gläschen 2 Tropfen Plazentarblut gesetzt worden waren, entstand nach mehreren Stunden in Glas 2 totale, in Glas 3 auch nach 24 Stunden nur partielle Hämolyse.

Damit ist es bewiesen, daß es sich hier um ein saures Saponin oder ein präformiertes Sapogenin handelt, welches hämolytische Wirkungen besitzt. Ein solches habe ich oben schon in der Droge nachgewiesen. Daß es in dem Handelsdekokt reichlich enthalten sein würde, war kaum zu erwarten, da die Reaktion des Dekoktes nicht alkalisch sondern spurweis sauer war. Es muß angenommen werden, daß in der Lösung des neutralen Saponins das saure wenigstens in der Hitze sich teilweise löst und beim Abkühlen des Dekoktes darin in Pseudolösung suspendiert bleibt. So könnte die Anwesenheit kleiner Mengen des sauren Saponins allenfalls sich erklären lassen. Für das Zerkochen war die Menge zu gering. Ich mußte also die Entscheidung darüber, ob wirklich kein Sapogenin sondern ein Saponin vorlag, zunächst offen lassen. Bei Wiederholung mit größeren Mengen des Dekoktes konnte ich später den Nachweis führen, daß ganz geringe Mengen des sauren Saponins in der Tat vorhanden waren.

2. Untersuchung auf das neutrale Saponin.

Im Filtrat des eben besprochenen sauren Saponins mußte sich die Gesamtmenge des neutralen Saponins aus dem Bleiniederschlag befinden. Dieses neutrale Saponin mußte im Gegensatz zu dem sauren auch in saurer Reaktion der Flüssigkeit gelöst werden. Da das Filtrat bei saurer Reaktion ganz klar war, war also die fragliche Substanz durch Säure in der Kälte nicht ausfällbar. Ich versuchte nun die Anwesenheit eines neutralen Saponins auf zweierlei Wege darzutun.

Erstens neutralisierte ich einen Teil des Filtrates, machte ihn durch Kochsalz isotonisch und brachte Mengen von 3, 2 und 1 ccm unter nachherigem Auffüllen mit Kochsalz auf 5 ccm. Jedes Gläschen sowie zwei Kontrollgläschen mit je 5 ccm Kochsalz wurden mit 2 Tropfen Plazentarblut versetzt. Es erfolgte entsprechend der Menge in den drei Gläschen Hämolyse, und zwar bei 3 und 2 ccm sofort, bei 1 ccm langsam.

Damit war biologisch die Anwesenheit reichlicher Mengen eines neutralen Saponins in der Bleifällung nachgewiesen.

Es kam nun darauf an, diesen Nachweis auch auf chemischem Wege, d. h. durch Zerkochen darzutun. In der Tat ergab sich beim Kochen eines Teiles der Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure eine voluminöse Ausscheidung, die beim Abkühlen gallertigen Charakter annahm und also offenbar das chemische Charakteristikum des Sapogenins bot. Diese gallertige Substanz wurde auf einem Filter gesammelt und das Filtrat auf Zucker geprüft, da hier kein präformiertes Zucker vorhanden war, während beim Dekokt an sich dies wohl der Fall war. Die Zuckerreaktion mit Fehling ergab sehr starke Reaktion, woraus zu schließen ist, daß entweder eine Hexose oder eine Pentose oder beides vorhanden ist. Die Pentosenreaktion mit Bial ergab keine Grünfärbung. Somit muß wohl angenommen werden, daß es sich hier nur um eine Hexose handelt.

Das Auftreten von Zucker beim Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren beweist uns, daß vorher ein gebundener Zucker, d. h. ein Glykosid, und zwar ein neutrales Saponin, vorhanden war.

Jetzt mußte noch der schon vorhin erwähnte, durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure gewonnene Niederschlag, der das Sapogenin des neutralen Saponins darstellte, auf seine hämolytische Wirkung geprüft werden. Der gewonnene Niederschlag wurde nach gehörigem Abtropfen und Waschen auf dem Filter mit natronhaltiger Kochsalzlösung zu etwa 15 ccm Flüssigkeit gelöst, klar filtriert und neutralisiert. Von dieser Flüssigkeit riefen 3 ccm, 1 ccm, ja selbst $^1/_2$ ccm beim Auffüllen auf 5 ccm sofortige Hämolyse von serumarmem Plazentarblut hervor.

Es war damit die Anwesenheit eines hämolytisch wirksamen Anfangssapogenins des neutralen Saponins erwiesen, und zwar ist die Wirksamkeit dieses Sapogenins nicht unbeträchtlich.

C. Gesamtergebnisse über die Untersuchung der beiden Handelswaren.

Zum Schluß fasse ich die Gesamtergebnisse der Versuche mit dem aus Herba Herniariae von mir selbst hergestellten und mit dem Riedelschen Dekokt zusammen.

Ich glaube durch vorstehende Versuche nachgewiesen zu haben:

1. daß in Herba Herniariae nicht nur eine sondern sogar zwei Saponinsubstanzen enthalten sind. Diese gehen in das Dekokt, wenigstens wenn dasselbe alkalisch hergestellt wird, über und zwar so reichlich, daß mit 10 g Droge alle hier nötigen Untersuchungen qualitativ ausgeführt werden können. Das von der Firma Riedel bezogene, wahrscheinlich ohne Alkali hergestellte Dekokt ergab, was das eine Saponin anbelangt, ebenfalls brauchbare Resultate, während das andere darin nur spärlich vorhanden war.

2. Durch Zusatz von Mineralsäure, und zwar am besten von verdünnter Schwefelsäure, läßt sich aus dem Dekokt die eine Substanz abscheiden; diese hat den Charakter eines sauren Saponins. Die Lösung ihres Natronsalzes in Kochsalz bewirkt Hämolyse. Dieses saure Saponin war bisher ganz unbekannt; es ist erst durch mich klar erkannt und abgeschieden worden.

3. Das Filtrat von dem sauren Saponin enthält das längst bekannte neutrale Saponin, welches ebenfalls hämolytisch wirkt. Es wurde dadurch nachgewiesen, daß beim Zerkochen ein voluminöses Sapogenin, welches ebenfalls hämolytisch wirkte, und ein Spaltungszucker auftrat. Wie schon Barth und Herzig angegeben haben, läßt sich das Sapogenin des neutralen Saponins aus Essigäther umreinigen. So gewannen Barth und Herzig es kristallinisch.

Es ist mir jedoch wahrscheinlich, daß ihnen dabei ein zweites Sapogenin, welches wohl wie das genannte in Methylalkohol aber nicht in Essigäther löslich ist, entgangen ist. Nach dieser Richtung hin sind chemisch weitere Versuche wünschenswert.

4. Bei der Herstellung eines Herniariadekoktes zu therapeutischen Zwecken ist der bisherige Modus des Abkochens mit Wasser aufzugeben, da dabei die Hauptmenge des sauren Saponins ungelöst bleibt. Kocht man aber unter Zusatz von mindestens 0,1 g Natrium carbonicum auf 10 g Herba Herniariae, so erhält man ein viel saponinreicheres und daher auch viel wirksameres Dekokt.

IV. Reindarstellung und Ermittlung des Wirkungswertes der Saponinsubstanzen der Herniaria.

Nachdem wir nun festgestellt haben, daß es sich in der Herniaria glabra wohl um 2 Saponine, ein saures und ein neutrales, handelt, gehen wir im folgenden dazu über, diese quantitativ zu bestimmen.

20 g Droge, gut zerkleinert, wurden unter Zusatz von etwas kohlensaurem Natron zweimal mit destilliertem Wasser ausgekocht und die abgepreßten Kolaturen vereinigt und filtriert. Ihre Menge betrug 250 ccm. Um festzustellen, ob die Droge erschöpft ist oder nicht, wurde sie noch ein drittes Mal wiederum unter Zusatz von Alkali ausgekocht und das Dekokt auf ein kleines Volumen eingedampft. Da dieses unter Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure noch einen reichlichen Niederschlag ausfallen ließ, ist daraus zu schließen, daß zweimaliges Auskochen der Droge trotz Zusatz von Alkali sie nicht erschöpft. Das bestätigte noch eine vierte Abkochung, die dasselbe Resultat wie die dritte ergab. Dagegen lieferten die 5. bis 8. Abkochung, die noch vorgenommen waren, bei Zusatz von Schwefelsäure kaum noch einen Niederschlag.

Die Tatsache, daß zweimalige alkalische Abkochung Saponindrogen keineswegs in bezug auf die durch Säure fällbaren Substanzen erschöpft, hatte auch schon mein Kollege T. Bulkowstein[1]) gemacht. Wie bei der von ihm untersuchten Hauhechel, so gilt auch für meine Herniaria der Satz, daß bei den späteren Abkochungen, wenn sie auch noch mit Säure eine Fällung liefern, der Saponingehalt der Fällungen immer geringer wird. Die Hauptmenge der durch vielmaliges Abkochen mit Alkali extrahierten Substanzen sind Pentosane, die mit Säure wie das saure Saponin ausfallen. Es wäre ein grober Irrtum, wollte man bei der Untersuchung alkalischer Pflanzendekokte auf saure Saponine die durch Mineralsäuren erzielten Fällungen nur auf Saponine beziehen; die Hauptmenge der Niederschläge besteht fast immer, wie ich nochmals betone, aus Pentosanen. Da die Pentosane beim Umreinigen der Fällungen z. B. mittelst Methylalkohol oder Aethylalkohol entfernt werden, tut man zum Zweck der quantitativen Saponingewinnung natürlich gut abzukochen, bis in einer Probe des Dekoktes kein Niederschlag mehr durch Säure zu erzielen ist.

Das Filtrat der vereinigten voluminösen Dekokte wird nach gehörigem, bei neutraler Reaktion vorgenommenem Einengen mit verdünnter Schwefelsäure gefällt. Das Filtrat der Fällung muß, wenn gehörig gewaschen wird, die Gesamtmenge des neutralen Saponins enthalten, während der gewaschene Niederschlag die Gesamtmenge des sauren Saponins und der Pentosane vorstellt. Beide Saponine werde ich unten einzeln besprechen. Da zu den später angeführten Blutversuchen die aus 20 g Droge gewonnenen Saponinmengen natürlich nicht genügten, wurden wiederholt neue Abkochungen der Droge in gleicher Weise vorgenommen.

[1]) T. Bulkowstein, Beiträge zur Kenntnis der Wirkungen und Bestandteile der Hauhechelwurzel. Dissert. Rostock 1914.

1. Gewinnung und Wirkungsstärke des neutralen Saponins.

Die vereinigten Dekokte der Droge wurden nach Abscheiden des darin befindlichen sauren Saponins durch Schwefelsäure filtriert, neutralisiert und eingeengt. Die dicke, salzreiche Masse, welche in der Schale beim Abkühlen erstarrte, wurde mit Methylalkohol heiß ausgezogen, wobei reichliche unwirksame Salzmassen ungelöst blieben. Die in Lösung gegangene Substanz ergab nach Verdunsten des Methylalkohols zunächst leider nur einen dunkelbraunen Rückstand. Dieser wurde nach zwei Methoden ungereinigt.

Methode I. Ein Teil des Rohsaponins wurde nach dem Eintrocknen von neuem in Methylalkohol gelöst, filtriert, mit wasserfreiem Äther ausgefällt und dann sowohl der Äther als die in Äther unlösliche Substanz untersucht. Im Verdunstungsrückstand des wasserfreien Äthers war keine hämolytische Substanz nachweisbar. Die durch Äther gefällte hellgelbe Substanz wurde getrocknet und gewogen. Sie erwies sich als reines neutrales Herniaria-Saponin und war fast aschefrei. Sie diente zu folgenden Versuchen:

Es wurde ganz frisches Plazentarblut vom Menschen, 2%ig in physiol. Kochsalzlösung suspendiert, verwendet. Davon wurden in 6 Gläschen je 5 ccm getan. Dazu kamen noch in Gläschen I als Kontrolle nur 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die übrigen Gläschen enthielten in den 5ccm NaCl noch Mengen von 30 mg, 20 mg, 10 mg und 2,5 mg obigen reinen neutralen Saponins. In Glas II—V trat sofort, in Glas VI nach einiger Zeit totale Haemolyse ein.

Ergebnis: Das neutrale Saponin, nach der Methylalkoholmethode rein dargestellt, wirkte auf ganz frisches Plazentarblut noch bei einer Verdünnung von 2,5 : 10 000 = 0,5 : 2000 = 1 : 4000 total hämolytisch. Die untere Grenze der Wirkung liegt aber wohl noch etwas tiefer.

Zur weiteren Feststellung der Wirkungsgrenze des neutralen Saponins wurde ein neuer Versuch mit 2% mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Kaninchenblut angesetzt. Kb bedeutet Kaninchenblut. Die römischen Ziffern bezeichnen die Nummern der Gläschen.

I = 5 ccm 2% Kb + 5 ccm NaCl, dient als Kontrolle.
II = 5 „ 2% „ + 5 „ „ , enthaltend 1 mg neutr. Sap.
III = 5 „ 2% „ + 5 „ „ , „ 0,5 „ „ „
IV = 5 „ 2% „ + 5 „ „ , „ 0,25 „ „ „
V = 5 „ 2% „ + 5 „ „ , „ 0,2 „ „ „
VI = 5 „ 2% „ + 5 „ „ , „ 0,1 „ „ „

Ergebnis: Nach 24 Stunden war in keinem Gläschen Hämolyse eingetreten, selbst nicht in der Verdünnung von 1 : 10000. Für Kaninchenblut liegt also die Grenze zwischen 1 : 4000 und 1 : 10000.

Ein dritter Versuch mit menschlichem Plazentarblut und gleichzeitig mit Kaninchenblut, den ich nun wohl nicht mehr in extenso anzuführen brauche, ergab bei 1 : 4000 bei beiden Blutarten binnen 3 Stunden Hämolyse, bei 1 : 5000 aber erst nach 16 Stunden und bei 1 : 6000 auch nach 24 Stunden nur noch partielle Hämolyse.

Ergebnis: Die untere Grenze der totalen Hämolyse von Menschen- und von Kaninchenblut liegt für das nach der Methylalkoholmethode dargestellte neutrale Saponin der Herniaria bei **1 : 5000.**

Methode II. Die Versuche an Blut wurden jetzt fortgesetzt mit einem ganz reinen neutralen Saponin, das nach der Kobertschen Bleimethode dargestellt worden war, d. h. es stammte aus der Bleiessigfällung des mit neutralem Bleiacetat vorgereinigten neutralen Dekoktes. Die durch Zersetzung des Bleiessigniederschlages mit der gerade ausreichenden Menge von Na_2Co_3 erhaltene Substanz wurde getrocknet. Sie bildete ein weißliches aschenarmes Pulver. Sie wurde ohne Alkalizusatz in physiol. Kochsalzlösung so gelöst, daß 1 ccm = 5 mg Substanz war.

Die biologische Prüfung der auf diese Weise gewonnenen Substanz bezog sich einerseits auf Blut und Blutkörperchen, andererseits auf Froschlarven.

Versuche an Blut und Blutkörperchen.

Benutzt wurde zunächst eine 1% Mischung von zentrifugierten Pferdeblutkörperchen, die allerdings schon mehrere Tage alt war, mit physiologischer Kochsalzlösung. Dazu wurde in fallenden

Dosen unser neutrales Saponin zugesetzt, um festzustellen, bis zu welcher Verdünnung noch eine Wirkung desselben nachweisbar ist Pfk bedeutet Pferdeblutkörperchen. Es wurden folgende Gläschen angesetzt:

I = 5 ccm 1 % Pfk + 5 ccm NaCl, als Kontrolle.
II = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, enth. 10 mg neutr. Saponin.
III = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 5 „ „ „
IV = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 3 „ „ „
V = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 2 „ „ „
VI = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 1 „ „ „
VII = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 0,6 „ „ „
VIII = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 0,4 „ „ „
IX = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 0,2 „ „ „
X = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 0,1 „ „ „
XI = 5 „ 1 % „ + 5 „ „ „, „ 0,05 „ „ „

In den Gläschen I—V trat sofort nach einmaligem Umschütteln, in den Gläschen VI—IX nach wenigen Minuten totale Hämolyse ein. Gläschen X zeigte nach $1^1/_2$ Stunden die der totalen Hämolyse eigene lackfarbene Beschaffenheit. In Glas XI war auch nach 24 Stunden nichts eingetreten.

Ergebnis: Das reine neutrale Saponin aus dem Bleiessigniederschlag wirkte noch in der Verdünnung von 0,1 mg : 10 ccm, d. h. **1 : 100 000** total hämolytisch auf isolierte mehrere Tage alte Pferdeblutkörperchen.

Ein analoger Versuch wurde mit einer 2 % physiologischen Kochsalz-Vollblutmischung von einem Hunde angestellt. Hdbl = Hundeblutsuspension.

I = 5 ccm 2 % Hdbl + 5 ccm NaCl, als Kontrolle.
II = 5 „ 2 % „ + 5 „ „ „, enth. 0,5 mg neutr. Saponin.
III = 5 „ 2 % „ + 5 „ „ „, „ 0,4 „ „ „
IV = 5 „ 2 % „ + 5 „ „ „, „ 0,2 „ „ „
V = 5 „ 2 % „ + 5 „ „ „, „ 0,1 „ „ „
VI = 5 „ 2 % „ + 5 „ „ „, „ 0,05 „ „ „

In Gläschen II und III trat sofort totale Hämolyse ein, in Gläschen IV erst nach 24 Stunden. Gläschen V zeigte nach 24 Stunden partielle Hämolyse, während im Gläschen VI keine Wirkung, auch keine partielle, zu konstatieren war.

Ergebnis: Somit liegt hier die Grenze bei 0,2 : 10 000, d. h. bei **1 : 50 000**. In dieser Verdünnung wirkt das reine neutrale Saponin der Bleimethode auf Hundeblut noch total hämolysierend.

Nach dem Muster von den beiden eben angeführten Versuchen wurden mit demselben Präparate noch Versuche mit Blut von Kaninchen, Katze, Hammel, Mensch, Affen, Meerschweinchen, Kalb, Schwein und Taube angestellt.

Es würde ermüdend wirken und zu weit führen, wenn ich alle diese Versuche im einzelnen genau beschreiben und aufführen wollte. Ich lasse daher anschließend nur eine Tabelle der Resultate der Versuche in der Reihenfolge ihrer Wirkungsstärke folgen:

Tabelle über die Wirkungen des nach der Bleimethode dargestellten neutralen Herniariasaponins.

Die folgenden 200fach verdünnten Blutkörperchen bezw. 100fach verdünnten Blutarten		wurden noch total hämolysiert in der Verdünnung von:
1.	Katzenblutkörperchen	1 : 200 000
2.	Pferdeblutkörperchen	1 : 100 000
3.	Kaninchenblutkörperchen . . .	1 : 100 000
4.	Hammelblutkörperchen	1 : 100 000
5.	Serumarmes Affenblut	1 : 100 000
6.	Serumarmes Katzenblut	1 : 100 000
7.	Katzenvollblut	1 : 50 000
8.	Serumarmes Hammelblut . . .	1 : 50 000
9.	Hundeblut	1 : 50 000
10.	Kaninchenblut	1 : 50 000
11.	Menschenblut	1 : 50 000
12.	Meerschweinchenblut	1 : 50 000
13.	Rinderblut	1 : 40 000
14.	Kalbsblut	1 : 33 333
15.	Hammelblut mit Vollserum . .	1 : 33 333

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß sich die Blutarten der verschiedenen Tiere dem neutralen Saponin

aus der Herniaria auch verschieden gegenüber verhalten. Jedoch finden sich eine ganze Reihe von Blutarten, die auch dieselbe Widerstandskraft zeigten. Am wenigsten vermögen der Wirkung des neutralen Saponin ganz serumfreie Katzenblutkörperchen zu widerstehen. Es folgen mit ebenfalls sehr niedriger Widerstandsfähigkeit Pferdeblutkörperchen, Kaninchenblutkörperchen, Hammelblutkörperchen, serumarmes Affenblut und serumarmes Katzenblut.

Diese starke Wirkung des nach der Bleimethode dargestellten neutralen Saponins ist der beste Beweis dafür, daß diese vor fast 30 Jahren von Kobert[1]) eingeführte und auch neuerdings[2]) wieder empfohlene Methode der getrennten Saponinabscheidung aus Drogen für den, der sie richtig zu handhaben versteht, doch recht gute Ergebnisse liefert. Der von japanischer und von französischer Seite erhobene Einwand, man verliere dabei die Substanz unter den Händen oder sie verliere wenigstens an Wirksamkeit, gilt eben nur für solche, die mit ihr nicht umzugehen wissen. Die ihr gegenüber in den Vordergrund gerückte Methylalkoholmethode ist zwar viel bequemer, lieferte mir aber ein viel weniger reines und daher weniger wirksames Präparat.

Unsere Versuche haben weiter die wichtige Tatsache von neuem bestätigt, daß durch dreimaliges Waschen mit der Zentrifuge ganz serumfrei gemachte Blutkörperchen durch Saponin schneller und viel stärker hämolysiert werden als das Blut mit Vollserum. Serumarmes Blut steht zwischen beiden. Dies beruht ja auf der Tatsache,

[1]) R. Kobert, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **23**, 1887, S. 233.

[2]) R. Kobert in Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, herausgegeben von Abderhalden, Bd. **2**, 1910, S. 980.

daß das Blutserum die auflösende Wirkung des Saponins auf die Blutkörperchen hindert. Der Stoff, um den es sich hierbei in dem Serum handelt, ist nach Ransom das Cholesterin, und zwar das nicht veresterte. Nach andern Autoren kommen in viel höherem Grade die Eiweißstoffe des Serums dabei in betracht. Von den Vollblutarten werden am wenigsten und schwersten das Blut des Hammels, Rindes und Kalbes von dem neutralen Herniariasaponin angegriffen. Noch niedere Resultate als mit den drei letzteren habe ich mit Schweineblut und Taubenblut erhalten. Diese im Vergleich zu den übrigen sehr niedrigen Resultate sind aber vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Wirkung meiner neutralen Saponinsubstanz durch längeres Stehenlassen erheblich geringer geworden war, was bei einzelnen Saponinen vorkommen kann. Aus diesem Grunde wie auch aus dem, daß der Versuch mit den beiden zuletzt genannten Blutarten nicht wiederholt nachgeprüft werden konnte, habe ich diese nicht mit in der obigen Tabelle aufgeführt, denn selbstverständlich ist es, daß ich alle in der Tabelle angegebenen Resultate mittelst mehrfach wiederholter Versuche geprüft habe.

Versuche an Kaulquappen.

Am Schluß dieses Kapitels über das neutrale Saponin erwähne ich noch einige Versuche mit Froschlarven. Es wurden eine Anzahl lebenskräftiger 3 cm langer Kaulquappen dazu verwandt.

Die Tierchen wurden in Gläschen, gefüllt mit 10 ccm H_2O, auf die Dosen von 5 mg und 1 mg neutralen Saponins kamen, gesetzt. Ein Gläschen wurde mit 9 ccm H_2O + 1 ccm NaCl, in das selbstverständlich auch eine Larve kam, als Kontrolle angesetzt. Schon nach 45 Minuten waren die Tiere in den beiden ersten Gläschen abgestorben, während die in dem letzten lebte. Eine Konzentration von 1 mg : 10 1 : 10 000 wirkte also schon binnen kurzer Zeit. Um die

neuere Wirkungsgrenze festzustellen, wurden folgende Reagenzgläschen, in die je eine Kaulquappe gesetzt war, aufgestellt:

I. 9 ccm H_2O + 1 ccm NaCl, als Kontrolle.
II. 9 „ „ + 1 „ „ , enthaltend 0,5 mg neutr. Saponin.
III. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,4 „ „ „
IV. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,2 „ „ „
V. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,1 „ „ „
VI. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,05 „ „ „
VII. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,025 „ „ „
VIII. 9 „ „ + 1 „ „ , „ 0,01 „ „ „

In Gläschen II—V hatte das neutrale Saponin die Kaulquappen nach 15 Stunden abgetötet, was auch nach 24 Stunden bei Glas VI und VII festgestellt werden konnte. Dagegen wurde nach dieser Zeit in Glas VIII die Kaulquappe noch lebend vorgefunden.

Das Ergebnis dieses Versuches ist also, daß das neutrale Saponin, nach der Bleimethode dargestellt, noch bei 0,025 mg : 10 ccm, d. h. bei 0,025 : 10 000 = 0,1 : 40 000 = **1 : 400 000** abtötend auf Froschlarven wirkt. Es ist für diese Tiere also ein sehr starkes Gift.

2. Gewinnung und Wirkungsstärke des Sapogenins aus dem neutralen Saponin.

Ein Teil des reinen neutralen Saponins wurde mit verdünnter Schwefelsäure zerkocht und das sich ausscheidende gallertige Sapogenin auf dem Filter gesammelt und gewaschen. Alsdann wurde es getrocknet, in Methylalkohol gelöst und mit Äther niedergeschlagen. Nun wurde gesondert der Äther und der Niederschlag untersucht. Auf den in Äther löslichen Teil komme ich später noch zurück. Zunächst wurde von dem Niederschlag, d. h. von dem in Äther unlöslichen Teile des Sapogenins, ein kleiner Teil sofort in physiol. Kochsalzlösung mit Hilfe eines Tropfens Natriumkarbonat gelöst und ein größeres über Schwefelsäure und Chlorcalcium getrocknet und zur Herstellung einer Lösung von bekanntem Gehalt bestimmt. Der nicht gewogene Teil wurde filtriert und zu einem Blutversuch mit 2% Rinderblut (Rbl) benutzt:

I. 5 ccm 2% Rbl + 5 ccm physiol. Kochsalzlösung als Kontrolle.
II. 5 „ 2% „ + 2 „ „ „ + 3 ccm Sapogenin.
III. 5 „ 2% „ + 3 „ „ „ + 2 „ „

In Gläschen II und III war sehr bald totale Hämolyse eingetreten.

Nun wurde mit der quantitativen Lösung der Versuch wiederholt. Aus der Gesamtmenge, die 17 g Droge entsprach, ergaben sich 103 mg Sapogenin. Dies wurde so gelöst, daß 1 ccm 5 mg entsprach. Dieselben wurden mit Kaninchenblutkörperchen und Rinderblutkörperchen angesetzt und bewirkten prompt Hämolyse.

Ergebnis: Für Kaninchenblutkörperchen machte das Sapogenin des neutralen Saponins noch totale Hämolyse bei 1,25 mg : 10 ccm, d. h. bei 1 : 8000. Vielleicht wirkt aber noch eine kleinere Dose. Die Entscheidung darüber blieb zunächst noch offen. Für Rinderblutkörperchen wurde dasselbe Resultat erzielt.

Der in Äther lösliche Teil des neutralen Sapogenins, dessen Menge gering war, wurde, nachdem er in Kochsalz unter Neutralisierung zu 10 ccm gelöst worden war, ebenfalls zu einem Blutversuch, und zwar mit Kaninchenblut (Kbl) verwandt:

I = 5 ccm 2% Kbl + 5 ccm physiol. Kochsalzlösung als Kontrolle.
II = 5 „ 2% „ + 2 „ „ „ + 3 ccm Sapogenin.
III = 5 „ 2% „ + 3 „ „ „ + 2 „ „
IV. = 5 „ 2% „ + 4 „ „ „ + 1 „ „

In Gläschen II war nach 5 Minuten, in III nach einer dreiviertel Stunde, in IV nach 24 Stunden totale Hämolyse eingetreten.

Derselbe Versuch wurde mit 1% dreimal zentrifugierten, frischen Kaninchenblutkörperchen mit gleichem Erfolg wiederholt. Hier wurde gleichzeitig auch noch mit dem in Äther unlöslichen Teile des Sapogenins aus dem neutralen Saponin noch ein Versuch gemacht, und zwar wurde auf die Hälfte der oben benutzten Dose heruntergegangen. Auch hier, also bei 1 : 16 000, trat Hämolyse ein, wenn auch erst nach 24 Stunden.

Ergebnis: Da alle Sapogenine in Äther etwas löslich sind, war auch das Sapogenin des neutralen Herniariasaponins in den Äther zum Teil übergegangen, so daß der Verdunstungsrückstand des Äther hämolytisch wirkte, nur daß die Ausbeute aus dem Äther nicht sehr groß war.

Im Anschluß hieran lasse ich eine Tabelle folgen, in der die Wirkungsstärke des Sapogenins aus dem neutralen Saponin auf die verschiedenen Blutarten, über die ich nicht alle Versuche im einzelnen anführen will, in uber-

sichtlicher Weise zusammengestellt ist. Ich habe schon einmal erwähnt, daß ich die hier wiedergegebenen Resultate immer erst nach wiederholter Nachprüfung und Bestätigung verwandt habe.

Das Sapogenin des neutralen Saponins wirkte auf 1—2 %iges Blut bzw. Blutkörperchen noch total hämolysierend bei der in der Tabelle angegebenen Konzentration.

	Blutart:	bei der Verdünnung von:
1.	Kaninchenblutkörperchen . . .	1 : 16 000
2.	Pferdeblut	1 : 14 285
3.	Meerschweinchenblut	1 : 14 285
4.	Serumarmes Hundeblut	1 : 12 500
5.	Schweineblut	1 : 11 111
6.	Serumarmes Hammelblut . . .	1 : 10 000
7.	Menschenblut	1 : 10 000
8.	Ziegenblut	1 : 10 000
9.	Katzenblut	1 : 8 000
10.	Rinderblutkörperchen	1 : 8 000
11.	Katzenblut	1 : 5 000
12.	Kalbsblut	1 : 5 000
13.	Taubenblut	1 : 3 333

3. Quantitative Gewinnung und Wirkungsstärke des sauren Saponins.

In den Seite 14 angeführten Vorversuchen mit dem von mir selbst hergestellten Herniaria-Dekokt hatte sich ergeben, daß in der Droge neben dem neutralen ein saures Saponin vorhanden ist. Hier handelt es sich um eine genauere Untersuchung des letzteren.

Aus den ersten drei Dekokten von 20 g Herba, die mit Soda angesetzt waren, wurde mittelst verdünnter Schwefelsäure ein volumi-

nöser Niederschlag gewonnen. Dieser wurde mit Wasser gewaschen, abgepreßt und dann noch etwas feucht einem dreimaligen Auskochen mit Methylalkohol unterworfen. Dabei löste sich nur der kleinste Teil, während der größere Teil, auf den ich noch weiter unten zurückgreifen werde, ja aus unlöslichen Pentosanen besteht. Die 3 Auszüge wurden heiß filtriert, verdunstet und der Rückstand in möglichst wenig wasserfreiem Methylalkohol gelöst und mit der dreifachen Menge Äther ausgefällt, auf dem Filter gesammelt, getrocknet und gewogen.

Ergebnis: Beim ersten Male ergaben sich auf trocknes Kraut bezogen nur 0,35% saures Saponin. Die Verarbeitung des Krautes wurde so oft nach derselben Richtung wiederholt, bis sich die Ausbeute nicht mehr steigerte. Sie beträgt für ganz trocknes Kraut in maximo **0,4% saures Saponin.** Dieselben Auszüge, aus denen das saure Saponin quantitativ gewonnen war, wurden dann auch quantitativ auf neutrales Saponin verarbeitet. Davon wird weiter unten die Rede sein.

Ein Teil des reinen sauren Saponins wurde in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von kohlensaurem Natron gelöst, neutralisiert und an dreimal gewaschenen, frischen Kaninchenblutkörperchen geprüft, indem in jedes Gläschen 2 Tropfen getan wurden.

I — 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, als Kontrolle.
II = 5 „ „ „ , enth. 3 mg saures Saponin.
III = 5 „ „ „ , „ 2 „ „ „
IV = 5 „ „ „ , „ 1 „ „ „
V - 5 „ „ „ , „ 0,5 „ „ „

In Gläschen II und III war schon nach 3 Minuten, in Gläschen IV nach 33 Minuten Hämolyse eingetreten. In Gläschen V war nach 24 Stunden noch keine totale Wirkung festzustellen.

Ergebnis: Das saure Saponin der Herniaria ist also wirklich ein Hämolytikum, da es noch bei **1 : 5000** gewaschene Kaninchenblutkörperchen total hämolysierte.

Das bestätigte auch noch ein Versuch mit 2% Meerschweinchenblut. Hier trat, da das Serum ja die Wirkung behindert, nur noch bei einer Verdünnung von 1 : 2000 nach 45 Minuten totale Hämolyse ein; aber

sie erfolgte eben doch und beweist, daß das saure Saponin nicht etwa nur auf serumfreie Körperchen einwirkt.

Der vorhin erwähnte, in Methylalkohol unlösliche Teil des sauren Dekoktniederschlages beim Gewinnen des sauren Saponins wurde, nachdem er zweimal mit heißem Methylalkohol ausgezogen war, auch zu Blutversuchen verwendet, um festzustellen, ob er nun saponinfrei sei. Es wurden dreimal zentrifugierte, gewaschene Kaninchenblutkörperchen und ein zweites Mal wiederum 2% Meerschweinchenblut benutzt. Beide Versuche ergaben unzweideutig, daß der Niederschlag noch keineswegs von Saponin frei war. Man muß daher das Auskochen mit Methylalkohol so lange fortsetzen, bis der Niederschlag keine hämolytischen Wirkungen mehr besitzt. Nur in diesem Falle darf man hoffen eine quantitative Ausbeute mittelst Methylalkohol zu bekommen.

4. Bewertung der Droge nach dem Kobertschen Verfahren.

Nach einem in pharmazeutitschen Blättern viel zitierten Vortrage, gehalten in der Pharmazeutischen Gesellschaft in Berlin, hat Kobert[1]) für eine Reihe saponinhaltiger Handelsdrogen eine Methode der biologischen Bewertung vorgeschlagen. Wie ich S. 21 erwähnte, habe ich die Filtrate, die ich nach der quantitativen Abscheidung des sauren Saponins bekam, auch noch quantitativ auf neutrales Saponin verarbeitet. Dabei erhielt ich **2,5% neutrales Saponin** als Ausbeute. Ich kontrollierte diese Zahl nach der Kobertschen Methode, in dem ich das nicht alkalische Dekokt des Krautes

[1]) Über die pharmakologische Bedeutung und die biologische Wertbestimmung der Sarsaparillen und ihnen verwandter Drogen. Ber. d. D. Pharmaz. Ges., Jg. **22**, 1912, S. 205.

hinsichtlich seiner Wirkungsstärke mit der Wirkungsstärke des reinen neutralen Saponins (nach der Bleimethode) an ein und demselben Blute, nämlich an Plazentarblut, verglich. Mein Dekokt zeigte, auf Kraut berechnet, im Durchschnitt die Wirkungsstärke 1 : 1500. Die Wirkungsstärke des reinen neutralen Saponins für Plazentarblut beträgt nach S. 24 1 : 50 000. Daraus berechnet sich ein Gehalt von **3,0 % neutralem Saponin.** Dies dürfte zutreffen, denn bei der Reindarstellung dürfte mir ein wenig vom Saponin verloren gegangen sein. Wasicki[1]) hat nach der Kobertschen Methode für verschiedene Handelssorten der Herniaria die Werte 1 : 1000—1 : 2000 gefunden, was zu meinen Angaben stimmt. Die Menge beider Saponine zusammengenommen beträgt also, falls für neutrales Saponin 3,0 % angenommen wird, **3,4 %**, und falls 2,5 % angenommen wird, **2,9 %**.

V. Versuche am Hund mit innerlicher Darreichung des Dekoktes.

Es wurden zwei Versuche am Hund mit innerer Darreichung von eingedampftem Herniariadekokt gemacht. Beide Hunde erhielten täglich das eingedampfte schwach alkalische Dekokt von 10 g Herba Herniariae, entsprechend mindestens 300 mg Saponine, mit Mehl und Zucker zu Pillen verarbeitet. Die Nahrung war täglich ganz dieselbe.

1. Wirkung auf den Harn.

Bei dem einen Hund, der ein Gewicht von 11 kg aufwies, wurde ein Vorversuch gemacht, wobei nur festgestellt werden sollte, ob der Hund, wenn er in den

[1]) R. Wasicki, Zur biologischen Prüfung der Arzneimittel. Pharmaz. Post, Jg. **46**, 1913, S. 989.

Kasten gesetzt wird zum Zweck der quantitativen Harngewinnung, etwa Kynurensäure abscheidet, deren Anwesenheit die Untersuchung auf Saponine erschwert, da sie mit diesen beim Ansäuern ausfällt. Die Resultate dieses Vorversuches, bei dem der Hund im Wassersaufen nicht beschränkt wurde, sind folgende:

Der Vorversuch begann am 3. April 1914 und endigte am 24. April. Alsdann begann die Fütterung. Der Harn wurde teils mit konzentrierter Schwefelsäure, teils mit konzentrierter Salzsäure versetzt, und zwar pro 100 ccm Harn mit 1 ccm. Er wurde dann gut durchgeschüttelt und blieb sich selbst überlassen ruhig stehen. Falls Kynurensäure anwesend war, hatte sich dieselbe durch Mitreißen von Farbstoff in Krystallen von sehr dunkler Farbe an dem Boden und den Wandungen des Gefäßes abgesetzt, so daß der Harn meist davon bei vorsichtigem Verfahren abgegossen werden konnte. Im anderen Falle wurde filtriert. Stets wurde die abgeschiedene Kynurensäure viele Male mit Wasser, dann mit kaltem Alkohol gewaschen. Zuletzt wurde sie in ihr Natriumsalz umgewandelt, in Wasser gelöst und aus diesem wieder ausgefällt durch Säure. Der normale Harn sowie das daraus gewonnene kynurensaure Natrium wirkten nie hämolytisch.

Ich lasse jetzt eine Tabelle folgen, die eine Übersicht über die Harnmenge an den einzelnen Tagen des Vorversuches geben soll und außerdem anzeigt, ob in dem Harn Kynurensäure nachweisbar war. Bemerken will ich noch einmal ausdrücklich, daß an diesen Tagen dem Hund noch kein Herniariadekokt verabreicht wurde.

Tabelle über die Harnmenge
und die Kynurensäureausscheidung
vor der Vergiftung.

Datum	Harnmenge	Bemerkungen
3. IV.	450 ccm normaler Harn	etwas Kynurensäure
5. IV.	550 „ „ „	„ „
6. IV.	550 „ „ „	„ „
7. IV.	450 „ „ „	reichlich Kynurensäure in sehr schönen Kristallen

Datum	Harnmenge	Bemerkungen
8. IV.	475 ccm normaler Harn	etwas weniger Kristalle
9. IV.	525 „ „ „	Spuren von Kynurensäure
10. IV.	450 „ „ „	fast nichts
11. IV.	500 „ „ „	„ „
12. IV.	425 „ „ „	reichlich Kynurensäure
13. IV.	500 „ „ „	reichlich Kynurensäure in schönen Kristallen
15. IV.	425 „ „ „	etwas Kynurensäure
16. IV.	420 „ „ „	fast keine Kynurensäure
17. IV.	430 „ „ „	gar „ „
18. IV.	475 „ „ „	„ „ „
19. IV.	450 „ „ „	fast „ „
20. IV.	500 „ „ „	„ „ „
21. IV.	525 „ „ „	gar „ „
22. IV.	460 „ „ „	fast „ „
23. IV.	445 „ „ „	„ „ „
24. IV.	470 „ „ „	keine Kynurensäure
25. IV.	430 „ „ „	„ „

Die Gesamtharnmenge an den 21 Tagen des Vorversuches und dem folgenden Tage nach Beendigung desselben beträgt 9905 ccm: das ergibt eine Durchschnittsharnmenge von **471,7** ccm pro Tag.

Hieran schließe ich jetzt eine Übersicht über die einzelnen Versuchstage während der Herniariadarreichung, die täglich als eingedampftes Dekokt von 10 g Kraut gegeben wurde, mit den dazu nötigen Bemerkungen an.

Das Dekokt wurde an 20 Tagen und zwar vom 26. April 1914 bis zum 15. Mai verfüttert. Der Harn zeigte folgende Veränderungen.

26. IV., 1. Versuchstag. 500 ccm Harn. Gestern abend hat die erste Darreichung stattgefunden. Trotzdem gibt der Harn mit HCl **gar keine Fällung.**

27. IV., 2. Versuchstag. 490 ccm Harn. Mit HCl eine Spur von Fällung. Dieselbe besteht jedoch nur in Kynurensäure.

28. IV., 3. Versuchstag. 410 ccm Harn. Sonst derselbe Befund wie gestern.

29. IV., 4. Versuchstag. 450 ccm Harn. Der Harn wirkt nicht hämolytisch. HCl fällt einen Niederschlag aus, der bei der Untersuchung sich nur als Kynurensäure erweist. Das Filtrat der Kynurensäurefällung, d. h. der gesamte Harn, wird eine Stunde mit HCl erhitzt, gibt aber auch dann keine Sapogeninfällung. Wohl aber gibt seit heute der Harn gleich frisch, also noch ohne daß er mit HCl gefällt ist, eine bis zum Ende der Fütterung andauernde Farbenreaktion, indem es beim Unterschichten mit starker Salpetersäure eine prachtvolle, rote bis rotviolette Ringbildung gibt. Das Farbenspiel des Gallenfarbstoffs ist weder heute noch an späteren Tagen wahrnehmbar.

30. IV., 5. Versuchstag. 440 ccm Harn. Um die den Farbenring gebende Substanz abzuscheiden, wird ein Teil des Harns mit Bleiacetat ausgefällt. Der gewaschene Bleiniederschlag gibt diese Reaktion nicht, wohl aber sein Filtrat. Kynurensäure ist nicht vorhanden. Ebenfalls ist kein Sapogenin nachweisbar, selbst nicht nach Kochen mit verdünnter Schwefelsäure. Hämolyse nicht vorhanden.

1. V., 6. Versuchstag. 450 ccm Harn. Derselbe wirkt nicht hämolytisch, enthält keinen Gallenfarbstoff, keine Kynurensäure, kein Sapogenin. Wohl aber gibt es den violetten Ring mit Salpetersäure.

2. V., 7. Versuchstag. 465 ccm Harn. Keine Kynurensäure vorhanden. Die HNO_3-Reaktion ist sehr deutlich. Kein Gallenfarbstoff nachweisbar. Beim Stehen des Harns in der Kälte mit Säure kein Niederschlag, wohl aber nach einstündigem Kochen mit 4,6 ccm konzentrierter Schwefelsäure. Der sich dabei bildende Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt, gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung und Na_2CO_3 neutral gelöst zu 10 ccm. 5 ccm dieser Lösung wirken auf einen Tropfen gewaschener Kaninchenblutkörperchen sofort total lösend. 3 ccm dieser Lösung + 2 ccm phys. NaCl lösen nach 28 Minuten, und 1 ccm + 4 ccm NaCl lösen über Nacht total. Der Harn an sich hatte nicht deutlich hämolytisch gewirkt.

3. V., 8. Versuchstag. 470 ccm Harn. Kein Gallenfarbstoff. Keine Kynurensäure. Wohl aber nach einstündigem Zerkochen mit 4,7 ccm konzentrierter H_2SO_4 eine flockige Ausscheidung, die gewaschen und gelöst auf Blutkörperchen vom Meerschweinchen und Kaninchen hämolytisch wirkt.

4. V., 9. Versuchstag. 425 ccm. Kein Gallenfarbstoff. Keine Kynurensäure. HNO_3 Reaktion wie immer vorhanden. Nach einstündigem Zerkochen mit 4,2 ccm konzentrierter H_2SO_4 eine flockige

Fällung, die gewaschen in NaCl und Soda neutral gelöst auf gewaschene Menschenblutkörperchen hämolytisch wirkt. Der Harn selbst wirkte nicht hämolytisch.

5. V., 10. Versuchstag. 500 ccm Harn. Weder Kynurensäure noch Gallenfarbstoff nachweisbar. HNO_3-Reaktion sehr stark. Trotzdem im Harn direkt mit vier verschiedenen Blutkörperchenarten keine Hämolyse nachweisbar. Zerkochen des Harns ergibt nur so wenig Niederschlag, daß eine hämolytische Prüfung nicht möglich ist.

6. V., 11. Versuchstag. 450 ccm Harn. Keine Kynurensäure, kein Gallenfarbstoff nachweisbar. In der Kälte fällt Salzsäure nichts aus und beim Zerkochen ergibt sich nur ein minimaler Niederschlag, der sich bei weiterer Reinigung auf dem Filter verliert. Der Harn an sich ergab keine Hämolyse.

7. V., 12. Versuchstag. 450 ccm Harn. Ein Teil des Harns wird mit neutralem, essigsaurem Blei gefällt. Der gewaschene Niederschlag ergibt mit HNO_3 keine HNO_3-Reaktion, wohl aber sein Filtrat intensiv. HCl gibt mit dem Harn weder in der Kälte noch in der Hitze eine Fällung. Hämolytische Eigenschaften besitzt der Harn nicht.

8. V., 13. Versuchstag. 490 ccm Harn. Der Harn wird mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure über Nacht kalt gestellt und ergibt keinen Niederschlag, wohl aber nach Erhitzen einen minimalen. Dieser Niederschlag, in der obigen Weise gelöst, wirkt auf gewaschene Blutkörperchen des Menschen schwach hämolytisch, der Harn an und für sich aber nicht. HNO_3-Reaktion im Harn direkt wie immer stark vorhanden.

9. V., 14. Versuchstag. 465 ccm Harn. HNO_3-Reaktion sehr intensiv. HCl gibt weder in der Kälte noch beim Kochen deutlichen Niederschlag. Kein Gallenfarbstoff, auch nicht mit Blei fällbar. Der Harn wirkt nicht hämolytisch.

10. V., 15. Versuchstag. 425 ccm Harn.

11. V., 16. Versuchstag. 430 ccm Harn.

Der Harn vom 15. und 16. Versuchstag wird zusammen verarbeitet und ergibt mit H_2SO_4 bei einstündigem Erhitzen einen Niederschlag. Dieser wird auf dem Filter gesammelt, gewaschen, in einem Tropfen Natronlauge gelöst und aus dem Filtrat mit HCl wieder ausgefällt. Nun in NaCl und Na_2CO_3 gelöst und neutralisiert ergibt er für gewaschene Kaninchenblutkörperchen hämolytische Eigenschaften und zwar recht stark.

12. V., 17. Versuchstag. 415 ccm Harn. Zum ersten Male wirkt der Harn an sich und zwar bei vierfacher Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung auf

frisches Menschenblut sowie auch auf Kaninchenblut und auf Hammelblutkörperchen hämolytisch. Es wird nun versucht, die hämolytische Substanz aus einem Teil des Harnes mittelst Blei abzuscheiden. Es gelingt jedoch weder im Bleiacetatniederschlag noch im Filtrat desselben, das mit Bleiessig versetzt ist, die Substanz nachzuweisen, wohl weil die verwandte Harnmenge zu gering war. Ein anderer Teil des Harnes wird mit H_2SO_4 zerkocht. Der sich dabei bildende Niederschlag erweist sich als hämolytisch wirksam.

13. V., 18. Versuchstag. 400 ccm Harn. Der Harn besitzt keine sicheren hämolytischen Eigenschaften, wohl aber der durch das Zerkochen mit H_2SO_4 erhaltene Niederschlag. Gallenfarbstoff nicht vorhanden, wohl aber der violette Ring mit HNO_3.

14. V., 19. Versuchstag. 390 ccm Harn. Im Harn nichts Hämolytisches nachweisbar, weder direkt, noch nach dem Zerkochen. HNO_3-Reaktion intensiv. Kein Gallenfarbstoff.

15. V., 20. Versuchstag. 450 ccm Harn. Kein hämolytisch wirkender Stoff, weder direkt noch nach dem Zerkochen nachweisbar. Kein Gallenfarbstoff, wohl aber HNO_3-Reaktion.

Von diesem Tage an wurde die Herniariafütterung abgebrochen. Jedoch wurde der Harn noch die folgenden 4 Tage weiter untersucht.

16. V., 410 ccm Harn. Beim Stehen mit HCl schon in der Kälte ein wenig Kynurensäure nachweisbar. Hämolytische Eigenschaften besitzt der Harn weder direkt noch nach dem Zerkochen. HNO_3-Reaktion vorhanden.

17. V., 390 ccm Harn. Keine Kynurensäure. Sonst wie am Tage vorher.

18. V., 405 ccm Harn.

19. V., 395 ccm Harn.

Der Harn von den beiden letzten Tagen wurde zusammen verarbeitet. HNO_3-Reaktion ist vorhanden. Sonst alles normal.

Aus diesem Versuche glaube ich folgende Ergebnisse ziehen zu dürfen:

1. Die Gesamtmenge des Harnes an den 20 Versuchstagen betrug 8565 ccm Harn. Danach berechnet sich die durchschnittliche Tagesmenge auf 428,2 ccm im Gegensatz zu der 471,7 ccm betragenden an den 20 Tagen vor der Herniariadarreichung. Eine diuretische Wirkung war also nicht nachweisbar, obwohl

das Mittel 20 Tage lang in Dosen von je 10 g Dekokt = 10 g Droge = 0,3 g Saponine gefüttert wurde.

2. Unzweifelhaft ging mehrere Male in den Harn, der an sich nicht hämolysierte, eine Substanz über, die beim Kochen mit verdünnter Mineralsäure einen hämolytisch wirkenden Niederschlag lieferte, nämlich ein Sapogenin. Im Harn war es als Saponin enthalten gewesen, aber in solcher Verdünnung, daß eine direkte Hämolyse nicht erfolgte, während das konzentriert gelöste Sapogenin diese Wirkung wohl hatte. Wäre es als Sapogenin im Harn enthalten gewesen, so hätte es auf Säurezusatz schon in der Kälte ausfallen müssen.

3. Nur einmal, aber erst nach 16tägiger Fütterung, war der Saponingehalt des Harns so groß, daß er auf verschiedene Blutarten direkt hämolytisch wirkte.

4. Im Gegensatz zu andern Saponinen veranlaßten unsre Fütterungen kein Auftreten von Gallenfarbstoff im Harn, also keine Hämolyse mit ihren Folgeerscheinungen.

Ein Versuch mit einem anderen Hund, dessen Gewicht 11,3 Kilo betrug, wurde schon vom 25. November 1913 bis zum 4. Dezember vorgenommen. Der Hund wurde täglich mit 10 g eingeengtem Dekokt aus 10 g Herba Herniariae gefüttert, indem das eingeengte Dekokt unter Fleisch gemischt wird. Die Harnverhältnisse, was Menge anlangt, ergeben sich aus der folgenden Tabelle, wobei zu bemerken ist, daß die Nahrung täglich in derselben Menge Hundekuchen und etwas Fleisch bestand. Beim Füttern konnte der Hund beliebig Wasser aufnehmen. Es wurde die tägliche Menge des Harnes auch 10 Tage vor dem eigentlichen Beginn der Herniariafütterung wie auch noch 20 Tage nach Schluß derselben festgestellt.

Bemerken will ich noch, daß die fragliche aus dem Harn abgeschiedene Substanz immer zu 10 ccm gelöst wurde und davon Mengen von 2- 3 ccm auf 10 probiert wurden.

Harnmenge des zweiten Hundes

vor		während		nach der Herniaria-Fütterung	
Tag der Vor-untersuchung	Menge	Datum	Menge	Datum	Menge
1. Tag	290 ccm	1. 25.—26. XI.	330 ccm	11. 5.— 6. XII.	350 ccm
2. „	282 „	2. 26.—27. XI.	350 „	12. 6.— 7. XII.	330 „
3. „	306 „	3. 27.—28. XI.	560 „	13. 7.— 8. XII.	475 „
4. „	320 „	4. 28.—29. XI.	490 „	14. 8.— 9. XII.	340 „
5. „	333 „	5. 29.—30. XI.	490 „	15. 9.—10. XII.	350 „
6. „	370 „	6. 30. XI.— 1. XII.	525 „	16. 10.—11. XII.	310 „
7. „	295 „	7. 1.—2. XII.	440 „	17. 11.—12. XII.	336 „
8. „	290 „	8. 2.—3. XII.	290 „	18. 12.—13. XII.	240 „
9. „	316 „	9. 3.—4. XII.	460 „	19. 13.—14. XII.	290 „
10. „	330 „	10. 4.—5. XII.	460 „	20. 14.—15. XII.	408 „
Gesamtmenge:	3132 ccm	Gesamtmenge vom 25. XI.—5. XII.:	4395 ccm	Gesamtmenge vom 11.—20. XII.	3429 ccm
				21. 15.—16. XII.	296 ccm
				22. 16.—17. XII.	330 „
				23. 17.—18. XII.	360 „
				24. 18.—19. XII.	320 „
				25. 19.—20. XII.	355 „
				26. 20.—21. XII.	260 „
				27. 21.—22. XII.	240 „
				28. 22.—23. XII.	340 „
				29. 23.—24. XII.	360 „
				30. 24.—25. XII.	340 „
				Gesamtmenge vom 21.—30. XII.	3201 ccm

Es ergibt sich also eine Durchschnittsharnmenge für die Vorperiode von 313,2 ccm, für die Zeit der Fütterung von 439,5 ccm, für die folgenden zehn Tage von 342,9 ccm und für die letzten zehn Tage von 320,1 ccm.

Über die hämolytische Substanz des Harns ist folgendes zu sagen:

Der Harn vom 28. XI., also am 3. Tage enthält, zum ersten Male eine nicht in der Kälte, wohl aber durch Kochen mit Säure fällbare, in Na_2CO_3 lösbare Substanz, die für Menschenblut in 14 Stunden total hämolytisch wirkt, während sie auf Menschenblutkörperchen sofort bei gleicher Menge dieselbe Wirkung hervorruft.

Harn IV vom 29. XI. Die durch Kochen mit Säure ausgefällte, mehrmals gereinigte Substanz wirkt auf Pferdeblutkörperchen und Kaninchenblutkörperchen rasch total hämolytisch.

Harn V vom 30. XI. enthält die Substanz nicht.

Harn VI und VII vom 1. und 2. XII. enthalten je eine kleine Menge heute zum ersten Male durch Säure schon in der Kälte fällbare Substanz, die Menschenblutkörperchen rasch hämolysiert.

Harn VIII vom 3. XII. enthält Spuren der eben genannten hämolytischen Substanz.

Harn IX vom 4. XII. gibt mit HCl schon in der Kälte einen sehr reichlichen Niederschlag. Da zu vermuten ist, daß dieser Kynurensäure mitenthält, wird er nach Umreinigen aus Natronlauge und neuer Fällung mit HCl auf dem Filter gewaschen, getrocknet und mit Essigäther ausgekocht. Dabei zeigt sich, daß nur der kleinste Teil der Substanz löslich, d. h. Sapogenin war. Diese kleine Menge aber wirkt auf Menschenblut energisch lösend ein. Der von Sapogenin befreite Rückstand wird noch einmal mit Methylalkohol ausgekocht, wobei noch Reste von Sapogenin gewonnen werden. Der auch darin nicht lösliche Teil besitzt keine hämolytische Wirkung.

Harn X vom 5. XII. liefert ebenfalls wieder in der Kälte beim Stehen einen voluminösen Niederschlag mit HCl. Auch dieser besteht aus einem Gemisch von Kynurensäure und Sapogenin. Das durch Essigäther und Methylalkohol ausziehbare Sapogenin wirkt auf Menschenblutkörperchen rasch hämolytisch, der Rückstand nicht.

Harn XI enthält ebenfalls wieder ein Gemisch von Kynurensäure und Sapogenin, wenn auch weniger Sapogenin.

Die Harne vom 8. X. und 11. XII. geben jeder einzeln mit Säure einen Niederschlag. Diese drei Niederschläge werden zusammen verarbeitet, da jeder einzeln zu gering ist. Es gelingt, ein für Kaninchenblutkörperchen hämolytisches Sapogenin herauszuziehen. Ebenso wirkt es auf Menschenblutkörperchen, auf ungewaschenes Blut aber nicht mehr.

An den unerwähnten Daten war kein Sapogenin und von jetzt an überhaupt keines wieder nachweisbar.

Die aus diesem Versuche zu ziehenden Ergebnisse weichen von denen des vorigen Versuches in zweierlei Hinsicht ab.

1. Die Verfütterung von eingeengtem Herniariadekokt, in Fleisch eingewickelt, wirkte in diesem Falle mäßig, aber immerhin doch deutlich diuretisch. Diese Wirkung hielt nach dem Aussetzen der Fütterung noch einige Zeit an.

2. Im Harn ließ sich einige Zeit nach Beginn der Fütterung eine geringe Menge Saponin nachweisen, das durch Zerkochen in ein wirksames Sapogenin überging. Kaltes Ansäuern lieferte in dieser Periode keinen wirksamen Niederschlag; ein präformiertes Sapogenin war also hier noch nicht nachzuweisen.

3. Nach einiger Zeit enthielt der Harn präformiertes Sapogenin teils neben Kynurensäure, teils ohne sie. Auch nach Schluß der Fütterung dauerte diese Ausscheidung noch an.

4. Zeichen von Blutzersetzung oder Nierenschädigung traten nicht auf.

Aus beiden Versuchen zusammengenommen möchte ich Folgendes schließen:

1. Nicht alle Hunde verhalten sich gegen Verfütterung von eingeengtem Herniariadekokt hinsichtlich der Harnmenge gleichmäßig; bei einem tritt

etwas Diurese ein, beim andern nicht. Die harntreibende Wirkung dürfte also nicht erheblich sein.

2. Auch hinsichtlich des Übergangs des neutralen Saponins in den Harn bestehen Verschiedenheiten, indem es bei dem einen sich unverändert, bei dem andern aber nach wenigen Tagen nur noch zu Sapogenin abgebaut vorfindet. Ganz regelmäßig ist die Ausscheidung weder des Saponins noch des Sapogenins, sondern an Menge recht wechselnd. Die Ausscheidung dauert nach dem Aussetzen der Zufuhr noch einige Zeit an.

Auch mein Kommilitone Fieger[1]) konnte bei seinem Versuche über die Ausscheidung von an Hunde verfütterten Saponinen durch den Harn dartun, daß teils unverändertes Saponin teils Sapogenin zur Ausscheidung kommt.

3. Auf Ausscheidung von Gallenfarbstoff, den Fieger im Harn nach Darreichung von drei verschiedenen Saponinen wahrnahm, habe ich zwar stets geachtet, konnte aber nie eine Spur davon konstatieren. Blutzersetzende Wirkung dürften die verfütterten Saponinmengen der Herniaria also kaum gehabt haben. Auch Albuminurie wurde nicht beobachtet.

2. Wirkung auf den Kot.

Nachdem ich an den beiden vorausgehenden Versuchen an Hunden nachgewiesen habe, daß durch die Fütterung mit Herba Herniariae teils Saponin, teils ein

[1]) Jos. Fieger, Über die Ausscheidung von Saponinen im Harn und ihre blutzersetzende Wirkung innerhalb des Organismus. Dissert. Rostock 1914.

Sapogenin im Harn erscheint, will ich jetzt über die Untersuchung des Hundekotes berichten. Was zunächst die Frage anlangt, ob unser Dekokt etwa analog dem Senegadekokt Durchfall erregt, so ist darauf zu antworten, daß an beiden Hunden weder Erbrechen noch Übelkeit noch Durchfall eintrat. Über die Form, in der das Saponin bzw. Saponingemisch des Dekoktes im Kot wiedergefunden wird, muß ich etwas eingehender berichten, und zwar zunächst, was den ersten Hund, dessen Gewicht gerade 11 kg betrug, anlangt.

Es handelt sich hier um die Frage, ob das Sapogenin, das während der Fütterung und noch einige Tage nachher im Harn erscheint, auch im Kot nachweisbar ist, oder ob dieser unverändertes Saponin enthält.

Zu diesem Zwecke wurde der Kot des Hundes vor den ersten zehn Tagen mit Auslassung der ersten drei Tage getrocknet, mit Petroläther im Soxhletapparat ausgezogen und dadurch entfettet. Zur Vorsicht wurde er dann nochmals mit Äther in demselben Apparat erschöpft. Das nun völlig fettfreie Pulver, dessen Auszug mit physiol. Kochsalzlösung an sich nicht hämolytisch wirkte, also kein neutrales Saponin enthielt, wurde mit Alkohol ausgekocht und der Alkoholverdunstungsrückstand mit Essigäther ausgekocht. Die Lösung wurde heiß filtriert und verdunstet. Es ergab sich eine hellbraune Substanz, die in physiologischer Kochsalzlösung beim Neutralisieren mit Natronlauge sich vollständig löste. 10 ccm davon wurden mit HCl ausgefällt. Der Niederschlag wurde gewaschen, getrocknet und gewogen. Es ergaben sich 84 mg einer hellgrauen Substanz, die Sapogenin sein konnte. Diese wurden wieder gelöst zu 10 ccm, so daß also der ccm 8,4 mg Sapogenin enthielt. 1 ccm dieser Lösung wirkte zu 5 ccm mit Kochsalz verdünnt auf Menschenblut sofort total hämolytisch, beim Verdünnen auf 10 ccm ebenfalls in wenigen Minuten total hämolytisch. Es wurde daher die Sapogeninlösung zehnfach verdünnt und neue Versuche angestellt. Auch von dieser Lösung, die 0,84 mg im ccm enthielt, wirkte 1 ccm zu 5 ccm verdünnt auf Menschenblut langsam, aber total lösend. Es wurde nun weiter verdünnt und als Grenze der totalen Hämolyse festgestellt für Menschenblut 1 : 7400 und für serumarmes Hammelblut 1 : 8800. Die für reines Sapogenin oben auf S. 29 angeführten Werte betragen für Menschenblut und Hammelblut 1 : 10 000.

Ergebnis: Da die in Untersuchung genommene Kotmenge nur ein kleiner Teil des vorhandenen war, so ergibt sich mit großer Sicherheit aus Obigem, daß der Kot dieses Hundes reichliche Mengen Sapogenin enthielt. Unverändertes Saponin war im Kot nicht nachweisbar.

Um dieses Resultat noch zu sichern und um noch genauer festzustellen, wie stark das im Kot vorhandene Sapogenin auf verschiedene Blutarten wirkt, habe ich, da noch eine reichliche Menge Kot vorhanden war, Versuche mit Hundeblut, Hammelblut, Kaninchenblut, Meerschweinchenblut, Schweineblut und Menschenblut angestellt, dem ich mir durch dreimalige Umreinigung ein möglichst reines Sapogenin dargestellt hatte. Es wurde jedes Mal, wenn es sich um Vollblut handelte, eine 2% physiologische Kochsalz-Blutmischung, bei einem Blutkörperchenversuch nur eine 1% hergestellt. In jedes Reagenzgläschen wurden 5 ccm Blutmischung getan. Dazu kamen dann fallende Dosen von 1 mg bis 0,05 mg Sapogenin, resp. noch tiefer. Alle Gläschen wurden bis zur Marke 10 mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Ein Kontrollgläschen, das natürlich jedes Mal angesetzt wurde, enthielt nur 5 ccm Blutmischung und 5 ccm Na Cl.

Dabei ergaben sich nun folgende in einer Tabelle zusammengestellten Resultate. Das nach Möglichkeit gereinigte Kotsapogenin wirkte gerade noch total hämolytisch

Nr.	für	bei
1	Hammelblutkörperchen	1 : 25 000
2	Schweineblutkörperchen	1 : 25 000
3	Hundeblutkörperchen	1 : 20 000
4	Meerschweinchenblut	1 : 20 000
5	Serumarmes Hammelblut	1 : 10 000
6	Hundeblut	1 : 10 000
7	Menschenblut	1 : 10 000
8	Kaninchenblut	1 : 8 000

Vergleicht man diese Tabelle mit der S. 29 angeführten, so ergibt sich, daß das Kotsapogenin

sehr rein von mir dargestellt war, denn sonst hätte es nicht so stark wirken können.

Am empfindlichsten gegen das Sapogenin des Kotes verhielten sich ganz serumfreie, dreimal gewaschene Blutkörperchen vom Hammel und vom Schwein; am stärksten und längsten widerstand der Hämolyse das Kaninchenblut. Daß serumfreie Kaninchenkörperchen gegen Sapogenin recht empfindlich sind, wurde S. 28 erwähnt. Die andern Blutarten liegen dazwischen.

Somit geht also bei einer Fütterung des Hundes mit Herba Herniariae nicht nur in den Harn des Versuchstieres Herniariasapogenin über, sondern es ist ein solches Sapogenin auch im Kote nachweisbar.

Zu weiterer therapeutischer Verwertung des Herniariadekoktes bei Leiden der Harnorgane ermutigen meine Versuche nicht. Will man die Droge aber doch in dieser Form verwenden, so würde es sich empfehlen, die Abkochung alkalisch herstellen zu lassen, z. B. nach der Formel Decoctum Herbae Herniariae 20 : 200 ope Natrii carbonici 0,1 paratum. D. S. 2stl. 1 Eßlöffel. Bei dieser Herstellungsweise wird wenigstens das saure Saponin, das sonst größtenteils ungelöst bleibt, mit verwertet. Welchen Anteil an der Wirkung das in der Droge enthaltene Seite 6 besprochene Kumarinderivat bei Menschen mit Blasenleiden hat, vermag ich nicht zu sagen. Ganz sicher wirkt es nicht erheblich diuretisch, denn bei meinen Versuchen wurde es ja mit verfüttert. Seite 7 habe ich die Vermutung ausgesprochen, daß es in Gemeinschaft mit dem Paronychin vielleicht die bei Tenesmus vesicae von Zeißl gerühmte „fast spezifische“ Wirkung entfaltet.

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Daebler, wurde am 20. Juni 1888 zu Prebberede bei Laage i. M. als Sohn des Landmannes August Daebler geboren. Ich besuchte von Michaelis 1897 bis Michaelis 1909 das Gymnasium zu Rostock, das ich mit dem Zeugnis der Reife verließ, um mich dem Studium der Medizin zu widmen. Ich studierte in Rostock, Heidelberg und Freiburg. Am 6. August 1914 bestand ich in Rostock die ärztliche Prüfung, am 18. September das Doktorexamen. Das praktische Jahr wurde mir erlassen.